

アニリン誘導体のメトヘモグロビン (MetHb) 形成と構造-活性相関

—試験管内法による検討—

金沢大学医学部衛生学講座 (主任: 橋本和夫教授)

濱 中 まさみ

(平成4年12月27日受付)

アニリン誘導体は広く化学工業の生産過程で取り扱われている有機化学物質である一方、人体に後天性メトヘモグロビン (Methemoglobin, MetHb) 血症, 神経障害その他の有害作用を及ぼすことが知られている。本研究ではアニリン誘導体における MetHb 形成能の予測を目的として、肝代謝活性系を用いた試験管内法により、19種類のパラ位アニリン誘導体の MetHb 形成率を調べ、これと物理・化学的構造との相関を解析した。その結果、MetHb 形成率25%にあたるアニリン誘導体濃度 (MetHb₂₅) は、アルキル及びハロゲン類などの同族体については、化学物質の疎水性をあらわす油・水分分配係数 logP との相関性が高く、また、logP と水素結合性の有無をあらわすダミー変数を説明変数とすると、全物質で有意な相関関係が得られた。MetHb₂₅ はまた、立体的置換基定数である MR, L と高い相関性を示した。一方、定性的には化合物内の電子吸引性部位の存在の場所により MetHb 形成能が高くなる傾向がみられたが、電子的置換基定数である σ とは有意な式は得られなかった。以上のことより、試験管内でのアニリン誘導体の MetHb 形成機構では、置換基の疎水性、立体効果、水素結合性が活性発現に対し重要となる可能性が示唆されるとともに、今後これらの構造特性から、MetHb 形成能未知の物質についての予測の可能性が開かれた。

Key words aniline derivatives, in vitro, methemoglobin, S-9 mix, QSAR

後天性メトヘモグロビン (Methemoglobin, MetHb) 血症は、血球中に存在する MetHb 還元系能力を越えて、MetHb の産生を促すような化学物質への暴露により引き起こされる。本症をひきおこす代表的な化学物質としては、亜硝酸塩、アニリン系色素類、アセトアニリド、スルフォナミド、ニトログリセリンなど多数知られている¹⁾。これらのうちとくにアニリン誘導体による MetHb 血症²⁾ および神経障害性については、古くから多くの報告がある。当教室原田³⁾ は、かつて、各種アニリン誘導体とマウス胎児由来線維芽細胞 Balb/3T3 との試験管内での直接反応によって、アニリン誘導体の毒性が、一般に化学物質の生物活性を決める上で重要と考えられている疎水性と、高い相関を示すことを明らかにした。これは、またアニリン誘導体の皮膚障害性^{3a)} の高さを示唆する結果でもあった。原田はまた、アニリン誘導体とヘモグロビンとの試験管内での反応の結果生じた MetHb を、等電点電気泳動法で分析し、誘導体による MetHb 形成能の差を明らかにした。しかし、この研究ではアニリン誘導体の代謝について考慮しなかったため、試験物質の構造と MetHb 形成との間に有意な相関関係を見いだし得なかった。本研究は、アニリン誘導体における MetHb 形成能の予測を目的として、ラット肝由来の代謝活性系およびラット血液を用いた試験管内法を用いて、アニリン誘導体の MetHb 形成率と物理・化学的構造との相関分析を試みた。この結果芳香族ア

ミンは、一般に試験管内でラット血液とそのまま反応させても MetHb 形成能を示さないが、肝由来の代謝活性系を共存させると MetHb を形成することが明らかとなった。また誘導体の MetHb 形成能とこれに係わる物理・化学的構造因子との相関を重回帰分析法によって検討した。また試験管内法による MetHb 形成能を生体内の形成能と比較するため、アニリン誘導体をラット腹腔内に投与し、一定時間後の血中 MetHb 量を測定した。この結果、両者の MetHb 形成能の間に有意な相関が得られ、生体内の MetHb 形成能推定のための、試験管内法の有用性が示唆された。これらの成績を報告する。

材料および方法

1. 被験物質

アニリン誘導体として、1. アニリン、およびそのパラ誘導体である 2. *p*-トルイジン、3. *p*-エチルアニリン、4. *p*-プロピルアニリン、5. *p*-イソプロピルアニリン、6. *p*-*n*-ブチルアニリン、7. *p*-フルオロアニリン、8. *p*-クロロアニリン、9. *p*-ブromoアニリン、10. *p*-ヨードアニリン、11. *p*-アミノフェノール、12. *p*-アニシジン、13. *p*-フェネチジン、14. *p*-アセトアミノフェン、15. *p*-アミノベンゾアミド、16. *p*-フェニレンジアミン、17. *p*-ニトロアニリン、18. *p*-アミノベンゾイックアミドメチルエステル、19. *p*-アミノベンゾイックアミドエチルエ

Abbreviations: DMSO, dimethyl sulfoxide; MetHb, methemoglobin; MR, molar refractivity OxyHb, oxyhemoglobin; QSAR, quantitative structure-activity relationship; SD, sprague-Dawley

ステル (図1) を用いた。アニリンのみ和光純薬工業 (大阪) より、他はすべて東京化成工業 (東京) より入手した。

II. 使用動物

8週令 Sprague-Dawley 系 (SD) ラット (体重 250±10g) を SLD (静岡) より、実験の数日前に購入し、22±2.0℃恒温室内で固形飼料 (MF, オリエンタル酵母, 東京) と水を自由に摂らせて飼育した。

III. 採決方法

ネンブタール (ダイナボット, 大阪) 麻酔下、右心房よりヘパリン処理した注射器を用いて行った。

IV. Hb 濃度測定 (シアン MetHb 法)

ヘモグロビンテストワコー (和光純薬工業) を用いて、540nm における吸光度を測定し、ヘモグロビン濃度を求めた。

V. アニリン誘導体による MetHb 形成反応

1. 試験管法における MetHb 形成率の測定

Ohta ら⁶ の方法を参考に、Hb 濃度が 1.8g/dl になるように、ラット赤血球懸濁液を調整し (全量 2.5ml)、これにラット肝由来の代謝活性系 S-9mix co-factor (オリエンタル酵母) 0.5 ml とアニリン誘導体溶液 0.05ml を加えて反応液とし、これを 37℃、30分間恒温槽にて 170/min の振とう速度でインキュベートした。アニリン誘導体溶液 (19種類) は、最終濃度が 0.05, 0.1, 0.5, 1.0mM としたが、誘導体の中で、精製水に溶けないものについては、20% ジメチルスルホキシド (dimethyl sulfoxide, DMSO) (和光純薬工業) で溶かしたのち、反応液に加えた。なお、予備実験によって、20% DMSO による MetHb 形成がないことを確かめた。30分の反応後、反応液 2ml をとり、これにリン酸緩衝液 (0.277% KH₂PO₄, 0.289% Na₂HPO₄, 0.05% Triton X-100; pH 7.8) 10ml を加え、10,000×g、10分冷却遠心した。遠心には高速冷却遠心機 (20PR-5 日立, 東京) を用いた。

2. 生体における MetHb 形成率の測定

ラットにアニリン誘導体溶液を体重 1kg あたり 10ml 腹腔内投与した。その 1時間後に血液 0.4ml を右心房より採血し、これにリン酸緩衝液 12ml を加えた。

VI. MetHb 測定 (シアン MetHb 法)

1. 2. より得られた上清を 4本のガラスセルに 3ml ずつ注した。これを No. 1~4. とし、Evelyn & Malloy の方法⁷ に従って、No. 1. には上清のみ、No. 2. には 10% KCN (和光純薬工業) 2滴、No. 3. には 20% K₃Fe (CN)₆ (和光純薬工業) 2滴、No. 4. には 10% KCN および 20% K₃Fe (CN)₆ 2滴ずつを加えて

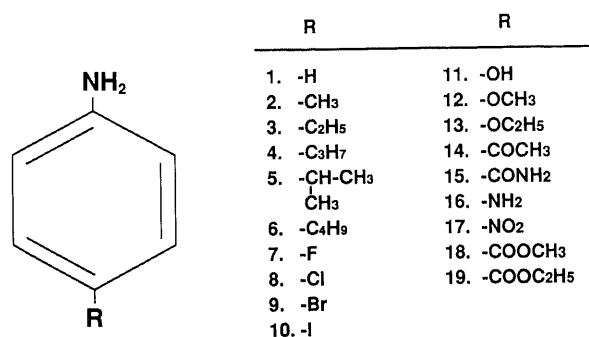


Fig. 1. Chemical structures of aniline derivatives examined in this study. All 19 compounds are *P*-substituted derivatives.

混和し、635nm において吸光度を測定した。測定には 200-20 型ダブルビーム分光光度計 (日立) を用いた。これらの値を用いて、以下の式により、MetHb (%) を求めた。

$$\text{MetHb (\%)} = \frac{\text{No. 1 の吸光度} - \text{No. 2 の吸光度}}{\text{No. 3 の吸光度} - \text{No. 4 の吸光度}}$$

VII. MetHb₂₅ 算出法

上記により求めた MetHb (%) をプロビット変換し、被験物質濃度の対数値に対する回帰方程式を最小 2 乗法で求め、これから MetHb 形成率 25% に相当する被験物質の濃度を算出した。

VIII. 構造-活性相関 (quantitative structure-activity relationship, QSAR)

MetHb 形成に係わると考えられる QSAR パラメータを化合物側から検定し、選定した。疎水性パラメータの logP は [C-LOGP] により算出し、電子的パラメータのうち Hammett の σ 以外は [MOPAC-PM3] により計算した。HB はダミー変数とし、HB 1 は水素受容性のものに 1 を与え、HB 2 は両性 (水素受容性かつ水素供与性) のものに 1 を与え、いずれもその他を 0 とした。MetHb 形成率 25% にあたるアニリン誘導体濃度 (MetHb₂₅) と logP, HB, MR, L の解析は Hansch らの方法⁸ に従い PASAR 重回帰分析プログラムを用いて、FACOM, M360R コンピューターにて行った。

IX. 等電点電気泳動

MetHb 形成機序を解析するため、1mM α -クロロアニリンとの反応で得られた MetHb について等電点電気泳動 (LKB PAG プレート, pH 3.5~9.5) を Tomoda²⁰ らの方法で行った。

X. 統計学的検討

MetHb 形成率のアニリン誘導体濃度対数値に対する回帰式の直線性の検定には、分散分析法を用いた。構造活性相関分析のため重回帰式の有意性は F 検定によった。いずれも $P < 0.05$ を有意とした。

成 績

I. S-9mix co-factor 添加の検討

Ohta らの方法⁶ に準じた S-9mix の添加の有無による MetHb 形成の違いを 19 物質について検討し、これらのうち α -クロロアニリンを用いた結果を図 2 に示した。S-9mix は、SD ラットの肝ミクロゾームより得られた代謝活性化酵素であり、これが添加されない場合は、MetHb 形成がほとんどみられないが、添加されることによりアニリン誘導体の代謝がなされ MetHb 形成が行われた (図 2)。ただし、被験 19 物質中、*p*-アミノフェノールのみ、S-9mix の添加に関係なく MetHb 形成があった (図 3)。

II. アニリン誘導体の濃度と MetHb 形成率の関係

アニリン誘導体の濃度と MetHb 形成率の関係を α -クロロアニリンを例として図 4 に示した。横軸にアニリン誘導体の対数をとると MetHb 形成率との間に有意な直線関係が得られた。19 種類のアニリン誘導体のうち *p*-フェニレンジアミン、*p*-アニジン以外の 17 種類においても同様な結果が得られ、それぞれアニリン誘導体の濃度が 0.05~0.5mM の範囲内でアニリン誘導体の濃度に依存して MetHb 形成率も上昇した。

III. 構造-活性相関

本研究に用いたアニリン誘導体の MetHb_{25} の逆数の対数値 $\log(1/\text{MetHb}_{25})$ と、疎水性 $\log P$ 、電子的置換基数 σP 、立体的置換基数 MR , L 、ダミー変数 (HB) を表1にまとめて示す。本実験での構造-活性分析によって得られた回帰式のうち統計学的に有意となったものの一部を次に示した。

$$\log(1/\text{MetHb}_{25}) = 0.958 \log P - 0.005 \quad \dots 1$$

$$n=15, r=0.707, s=0.766, F=13.0$$

$$\log(1/\text{MetHb}_{25}) = 1.595 \log P + 1.545 \text{HB} - 1.711 \quad \dots 2$$

$$n=15, r=0.918, s=0.448, F=32.0$$

$$\log(1/\text{MetHb}_{25}) = 0.147 \text{MR} + 0.136 \quad \dots 3$$

$$n=14, r=0.869, s=0.389, F=36.9$$

$$\log(1/\text{MetHb}_{25}) = 0.714 \log P - 0.625 \quad \dots 4$$

$$n=13, r=0.823, s=0.332, F=23.0$$

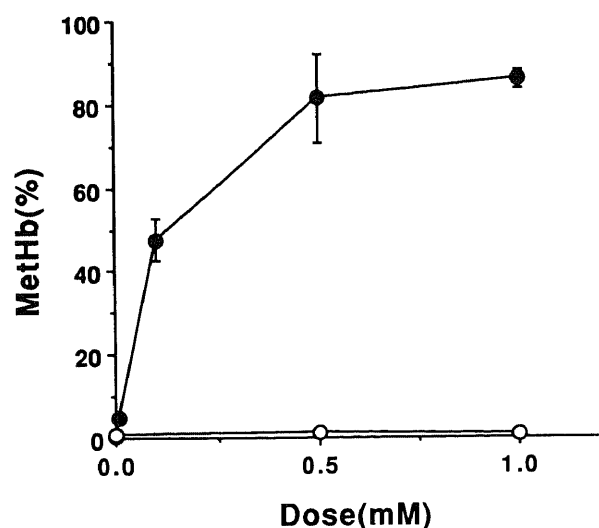


Fig. 2. Effects of S-9 mix on MetHb formation *in vitro* with *p*-chloroaniline. MetHb formation was seen only under the presence of S-9 mix after incubation at 37°C for 30 min. ○—○ without S-9 mix, ●—● with S-9 mix.

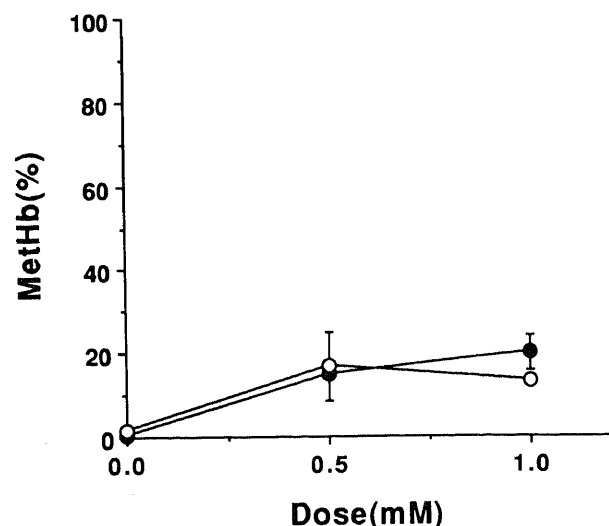


Fig. 3. MetHb formation *in vitro* with *p*-aminophenol with or without S-9 mix. MetHb formation was same after incubation at 37°C for 30 min under the presence or absence of S-9 mix.

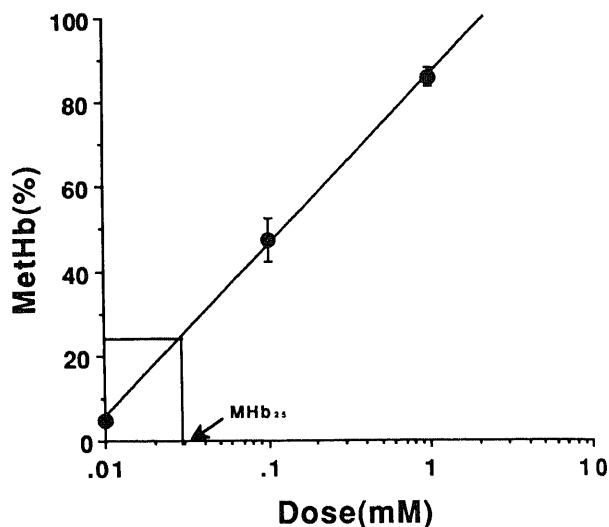


Fig. 4. Dose response relationship of MetHb formation *in vitro* with *p*-chloroaniline. Dose response relationship of MetHb formation *in vitro* with *p*-chloroaniline. MetHb₂₅ was determined after a Probit transformation of *p*-chloroaniline concentration. MetHb₂₅ of other aniline derivatives were determined in the same manner.

$$\log(1/\text{MetHb}_{25} \text{ (vivo)}) = 0.342 \log(1/\text{MetHb}_{25} \text{ (vitro)}) + 0.156 \quad \dots 5$$

$$n=11, r=0.526, s=0.438, F=3.5$$

式1, 2, 3, は試験管内法における回帰式であり, 式4は生体内法における重回帰式である。式5は試験管内と生体におけるMetHb形成率の間の回帰式である。式1と2は全物質について, 式3は, $-\text{CONH}_2$ を除く全物質についての式である。各式で, n は分析に用いたアニリン誘導体の数, r は重相関係数, s は標準偏差を示す。これらの結果より化合物の疎水性が高く, 置換基がかさ高いほど, MetHb形成能が大きくなり, また置換基が水素結合性基の場合には, その効果は増大することが示唆された。図5に示すように, $\log P$ においては試験管内法, 生体内法とも有意な結果となっている。ただし, $-\text{CONH}_2$ は立体的パラメータ (MR , L) との相関において例外物質となっている。試験管内と生体内の間の $\log P$ における相関は図6に示した。

IV. 等電点電気泳動

試験管内法でのMetHb形成能の最も強い化合物の1つである, *p*-クロロアニリンとの反応で得られたMetHbの等電点電気泳動パターンを図7に示す。対照コントロールとS-9mix cofactorを添加しないものをおいたところ, 対照はオキシヘモグロビン (oxyhemoglobin, OxyHb) が多く認められるのに対し, *p*-クロロアニリンを添加したものは, OxyHbから部分酸化物や完全酸化物であるMetHbへと変化していることが明らかであった。

考 察

MetHb血症は, 赤血球中のヘモグロビンのヘム鉄が2価 (Fe^{2+}) から3価 (Fe^{3+}) に酸化されてMetHb含量が異常に増加する疾患である。赤血球はMetHb形成の進行により溶血が引き起こされ, 赤血球の酸素運搬能が低下する。このため組織呼吸が不十分となり, とくに末梢部は低酸素症をおこし, その結

果、チアノーゼ、貧血、頭痛、めまい、呼吸困難などの症状を呈する⁹⁾。

本研究は、アニリン誘導体19種類における MetHb 形成能を測定するための試験管内法を確立し、ついでその構造・活性相関の検討を行った。化学物質による MetHb 形成機構については、図8の Step 1 で示すようにアニリン誘導体をはじめとす

る芳香族アミンは、そのままでは MetHb 形成能をもたず、肝その他の組織に存在するチトクローム P450 によって代謝活性化され、N-水酸化体になって初めて作用があらわれる^{10)~12)}。このことは、図2でみられるように S-9mix の有無による形成能の違いからも裏付けられる。次に Step 2 として、赤血球内に到達した N-水酸化体は OxyHb との共役酸化^{13)~16)} (coupled

Table 1. Physico-chemical parameters of aniline derivatives used in this study

Compound	log (1/MHb ₂₅) in vitro	log (1/MHb ₂₅) in vivo	log P	σ_p	MR	L	B1	HB
1. Aniline	-0.30	0.13	0.92	0.00	1.03	2.06	1.00	0
2. p-Toluidine	0.72	-0.056	1.41	-0.17	5.65	3.00	1.52	0
3. p-Ethylaniline	1.17	0.43	1.94	-0.15	10.30	4.11	1.52	0
4. p-n-Propylaniline	1.92	1.43	2.47	-0.13	14.96	5.05	1.52	0
5. p-iso-Propylaniline	2.17	—*	2.34	-0.15	14.98	4.11	2.04	0
6. p-n-Butylaniline	2.66	1.62	3.00	-0.16	19.59	6.17	1.52	0
7. p-Fluoroaniline	0.46	0.62	1.34	0.06	0.92	2.65	1.35	0
8. p-Chloroaniline	1.54	1.14	1.91	0.23	6.03	3.52	1.80	0
9. p-Bromoaniline	1.82	0.75	2.06	0.23	8.88	3.83	1.95	0
10. p-Iodoaniline	2.12	0.58	2.32	0.18	13.94	4.23	2.15	0
12. p-Anisidine	—*	-0.34	1.00	-0.27	7.87	3.98	1.35	1
13. p-Phenetidine	2.10	0.73	1.53	-0.24	12.47	4.92	1.35	1
14. p-Aminoacetophenone	1.74	0.29	0.86	0.50	11.18	4.06	1.90	1
15. p-Aminobenzamide	-1.08	—*	-0.25	0.36	9.81	4.06	1.60	1
16. p-Phenyldiamine	—*	—*	-0.31	-0.66	5.42	2.93	1.50	1
17. p-Nitroaniline	1.24	—*	1.36	0.78	7.36	3.44	1.70	1
18. p-Aminobenzoic acid methyl ester	2.92	—*	1.39	0.45	12.87	4.85	1.90	1
19. p-Aminobenzoic acid ethyl ester	2.95	0.74	1.92	0.45	17.47	5.96	1.90	1

*too low to determine log P, logarithm of the partition coefficient in 1-octanol/water. The log P data were calculated by [CLOGP] program. σ : Hammett's constants characterizing the electron-withdrawing power of the substituent. MR: molar refractivity. L, B₁: STERIMOL steric parameters. The STERIMOL parameter consists of five parameters to describe the length and various width in defined direction of the substituent. The length, L, is defined as the longest axis of the substituent from its point of attachment. The other parameter, B₁ is the minimum width of the substituent in rectangular directions. HB: indicator variable, 1 for the presence and 0 for the absence of hydrogen bonding substituent.

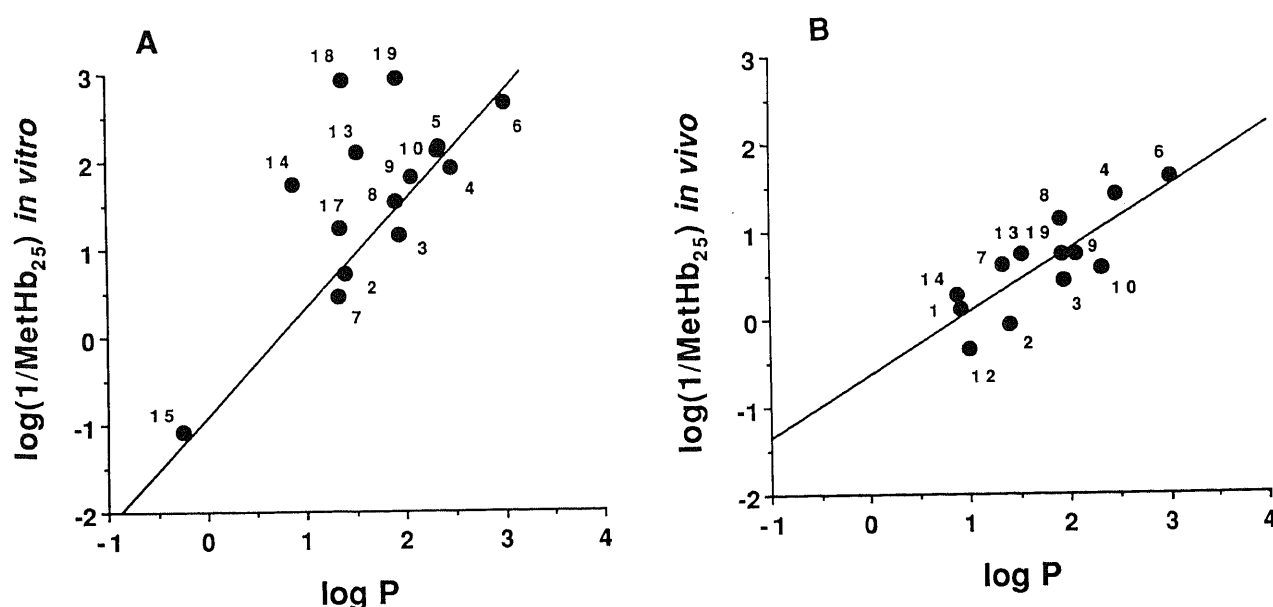


Fig. 5. Relationship between log P and MetHb₂₅ of aniline derivatives. (A) *in vitro*; Regression equation, $\log(1/\text{MetHb}_{25}) = 1.595 \log P + 1.545$ HB-1.711 ($n=13$, $r=0.918$, $s=0.448$, $F=32.0$) (B) *in vivo*; Regression equation, $\log(1/\text{MetHb}_{25}) = 0.714 \log P - 0.625$ ($n=13$, $r=0.823$, $s=0.332$, $F=23.0$).

oxidation) により, N-水酸化体自身は NO 体になるとともに OxyHb は Hb-Fe^{3+} (MetHb) となる. 生成した MetHb および NO 体は MetHb 還元酵素¹⁷⁾ により再び HbO_2 , N-水酸化体に還元される. また NO 体はグルタチオン (Glutathione, GSH) との反応¹⁸⁾ で非酵素的にも N-水酸化体に還元される. 再生した N-水酸化体が再び MetHb 形成を行うことにより結果的に少量の N-水酸化体の存在下で MetHb 形成が赤血球内で繰り返される^{19,20)} (図 8).

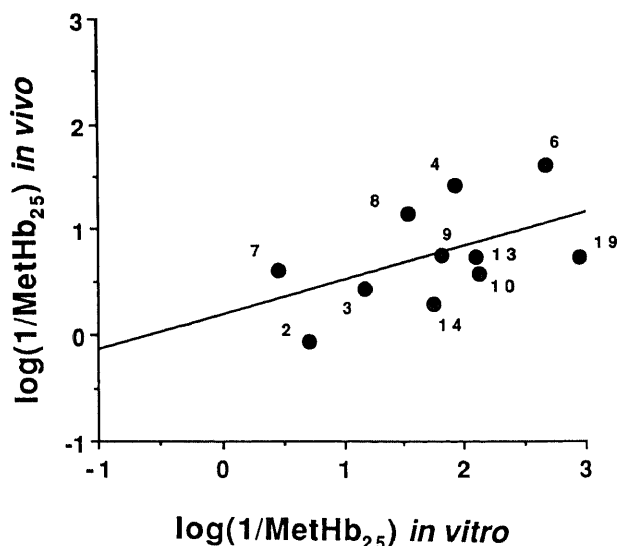


Fig. 6. Relationship between $\log(1/\text{MetHb}_{25})$ *in vitro* and $\log(1/\text{MetHb}_{25})$ *in vivo*. Regression equation, $\log(1/\text{MetHb}_{25})$ (*in vivo*) = $0.342 \log(1/\text{MetHb}_{25})$ (*in vitro*) + 0.156 ($n=11$, $r=0.526$, $s=0.438$, $F=39$). No. of each point corresponds to that in Fig. 1.

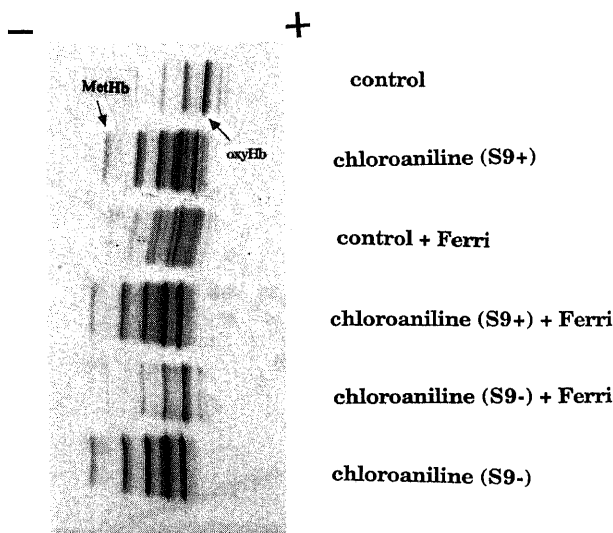


Fig. 7. Isoelectric-focusing electrophoresis patterns on a polyacrylamide gel plate (pH 3.5~9.5) of rat hemoglobin solutions which were incubated with aniline derivatives. S9, S-9 mix; Ferri, potassium ferricyanide. Remarkable methemoglobin formation was observed in *p*-chloroaniline with S-9 mix. Oxyhemoglobin was clearly observed without S-9 mix.

次に本研究で用いられた試験管内法により得られた結果を, いくつかのパラメータを用いて解析した構造・活性相関と, 試験管内法と生体内法の結果についての活性・活性相関について考察する. 回帰式 1 は, 試験管内法で得られた結果を, 疎水性パラメータとしての *n*-オクタノール-水分配係数 $\log P$ を用いて算出したものである. この式は, 化合物の疎水性が増すほど, MetHb 活性が高まることを示している. これに水素結合性の有無をあらわすダミー変数を加えたものが重回帰式 2 であり, 置換基が水素結合性 (hydrogenbonding property) の場合, その効果は増大することを示唆する結果となった. しかし, これらの式において, アニリン, *p*-アミノフェノール, *p*-アニシジンおよび *p*-フェニレンジアミンは例外物質として QSAR 解析より除外した. これらは, 高濃度を用いても, MetHb 形成がみられなかったためである. この理由として, まずアニリンについては, 置換基の存在しないことが影響していると考えられ, *p*-フェニレンジアミン ($-\text{NH}_2$) は, その疎水性の低さで理解できる. *p*-アニシジン ($-\text{OCH}_3$) が非活性となった原因はなお不明であるが, 高活性の *p*-フェネチジン ($-\text{OC}_2\text{H}_5$) と, 置換基の電子吸引性を示す σP (Hammett の電子的置換基定数) の値にそれほど差がなかったことから, 置換基の立体因子が関与している可能性が考えられる. 図 5 (A) で示したように, *p*-フェネチジン, *p*-アセトアミノフェノン, *p*-アミノベンゾイックアミドメチルエステル, *p*-アミノベンゾイックアミドエチルエステルが回帰直線よりはずれた. これらは全て *p*-置換基が水素結合性を有しており, このことがダミー変数を加える根拠となった. *p*-アミノフェノールについては, 図 3 のように S-9mix の添加に関係なく MetHb 形成がみられた. これは, *p*-アミノフェノールが生体内でのアニリン誘導体の活性代謝産物であるとの報告^{21~24)} があり, そのために S-9mix 添加の影響を受けなかったものと考えられる. 次に回帰式 3 は, モル屈折をあらわす MR を用いて算出した式である. これは置換基がかさ高いほど MetHb 活性が増大することを示している. 図 5 (B) で示すように, 回帰直線から *p*-アミノベンザアミド ($-\text{CONH}_2$) がはずれているが, これはその疎水性が低く ($\log P = -0.25$), 作用部位と考えられるヘム蛋白の疎水性ポケット¹⁰⁾ に到達しにくいため, 結果的に立体因子が直接活性発現に寄与しなかったことによると考えられる. 回帰式 4 は, 生体内で得られた結果と $\log P$ の関係を算出した式であるが, 試験管内法と同様, 有意な相関が得られた. しかし MR では, 試験管内法に比べ相関係数が低くなり, また試験管内法では活性の低かったアニリンが比較的高い活性をあらわしている. これは生体法での解毒機構における未知の部分であらわし, 今後の研究, 検討の必要性がうかがわれた. *p*-イソプロピルアニリン, *p*-アミノベンゾイックアミドメチルエステル, *p*-ニトロアニリンは, 生体法では溶媒自体の MetHb 形成以外の臓器毒性の可能性があるので, 高濃度では使用できず低濃度暴露となったため, 十分な活性が得られず今回の解析より除外した. 回帰式 5 は, 試験管内と生体内での活性・活性相関であることがこの結果は相関が十分とはいえず, その要因として, 試験管内で使用した血液のヘモグロビン濃度が生体内の条件よりも低いこと, 生体内での代謝機構の複雑なことなどが挙げられる. しかし, MetHb 形成機構では, 置換基の疎水性, 立体効果, 水素結合性が活性発現に対し重要となる可能性が示唆され, MetHb 形成能未知の物質についての予測の可能性が開かれた.

of oxyhemoglobin and sulfhemoglobin in a single sample of blood. *J. Biol. Chem.*, **126**, 655-662 (1983).

8) **Hansch, C. & Fujita, T.**: ρ - σ - π -Analysis. A method for the correlation of biological activity and chemical structure. *J. Am. Chem. Soc.*, **86**, 1616-1626 (1969).

9) **Galiana, A., Georges, B., Decun, J. F., Mazerolles, M., Cabot, C., Fabre, M. & Virenque, C. H.**: Methemoglobinemia et intoxications accidentelles. *Urgences*, **10**, 237-241 (1991).

10) **武森重樹, 小南恩郎**: up バイオロジー・チトクローム P-450 (吉岡 和, 山村進一, 織田敏次編), 第1版, 14-29 頁, 東京大学出版会, 東京, 1990.

11) **齋藤 烈, 松浦輝男**: 酵素および活性酸素種の物理化学. 活性酸素種の化学, 化学総説, **7**, 3-28 (1990).

12) **Loew, G. H. & Goldblum, A.**: Metabolic activation and toxicity of acetaminophen and related analogs, a theoretical study. *Mol. Pharmacol.*, **27**, 375-386 (1985).

13) **Exey, P.**: Detoxication of N-oxygenated arylamines in erythrocytes. An overview. *Xenobiotica*, **18**, 1327-1333 (1988).

14) **Kiese, M.**: The biochemical production of ferrihemoglobin forming derivatives from aromatic amines, and mechanisms of ferrihemoglobin formation, *Pharmacol. Rev.*, **15**, 1001-1141 (1980).

15) **Lindeke, B.**: The non- and postenzymatic chemistry of N-oxygenated molecules. *Drug Metab. Rev.*, **13**, 71-121 (1982).

16) **Lenk, W. Riedl, M.**: N-hydroxy-N-arylacetamides. V. Differences in the mechanism of haemoglobin oxidation in vitro by N-hydroxy-4-chloroacetanilide and N-hydroxy-4-chloroaniline. *Xenobiotica*, **19**, 453-475 (1989).

17) **Gregory, L. K. Pharm, D. & Debra, H. F.**: Metoclopramide-induced Methemoglobinemia. *Pediatrics*, **82**, 364-366 (1988).

18) **Eyer, P.**: Reactions of nitrosoarenes with sulphhydryl groups: reaction mechanism and biological significance. In

J. W. Gorrod, & L. A. Damani, (eds.), *Biological Oxidation of Nitrogen in Organic Molecules*, 1st ed. p386-399, Ellis Horwood, Chichester, 1985.

19) **山口照英, 兼田瑞穂, 柿沼力ツ子**: 生体における活性酸素生成とその役割. トキシコロジーフォーラム, **8**, 129-139 (1985).

20) **Lenk, W. & Sterzl, H.**: Mechanism of hemoglobin oxidation by N-hydroxy-N-arylacetamides in vivo and in vitro. In J. W. Gorrod, & L. A. Damani, (eds.), *Biological Oxidation of Nitrogen in Organic Molecules*, 1st ed. p409-422, Ellis Horwood, Chichester, 1984.

21) **Harrison, I. H. & Jollow, D.J.**: Contribution aniline metabolites to aniline-induced methemoglobinemia. *Mol. Pharmacol.*, **32**, 423-431 (1987).

22) **Nagasawa, H. T. & Gutmann, H. R.**: The oxidation of o-aminophenols by cytochrome C and cytochrome oxidase. I. Enzymatic oxidations and binding of oxidation products to bovine serum albumin. *J. Biol. Chem.*, **234**, 1593-1599 (1959).

23) **Nagasawa, H. T., Gutmann, H. R. & Morgan, M. A.**: The oxidation of o-aminophenols by cytochrome C and cytochrome oxidase. II. Synthesis and identification of oxidation products. *J. Biol. Chem.*, **234**, 1600-1604 (1959).

24) **Tomoda, A., Yamaguchi, J., Kojima, H., Amemiya, H. & Yoneyama, Y.**: Mechanism of o-aminophenol metabolism in human erythrocytes. *FEBS. Lett.*, **196**, 44-48 (1986).

25) **Pereira, M. A. & Chang, L. W.**: Binding of chemical carcinogens and mutagens to rat hemoglobin. *Chem. Biol. Interact.*, **33**, 301-305 (1981).

26) **Alberecht, W. & Neumann, H. G.**: Biomonitoring of aniline and nitrobenzene. Hemoglobin binding in rats and analysis of adducts. *Arch. Toxicol.*, **57**, 1-5 (1985).

27) **Birner, G. & Neumann, H. G.**: Biomonitoring of aromatic amines II. Hemoglobin binding of some monocyclic aromatic amines. *Arch. Toxicol.*, **62**, 110-115 (1988).

Evaluation of Methohemoglobin Forming Potency of Some Aniline Derivatives in vitro and the Structure-activity Relationships Masami Hamanaka, Department of Hygiene, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Jusen Med Soc., **101**, 1014—1021 (1992)

Key words aniline derivatives, in vitro, methemoglobin, S-9mix, QSAR

Abstract

Aniline derivatives are widely used in the production of various chemicals, but are known to cause acquired methemoglobinemia, neuropathy and other organic disorders. The objective of this study is to develop a rapid *in vitro* method to measure the methemoglobin (MetHb) forming potency of 19 ρ -substituted aniline derivatives in rat blood in the presence of hepatic metabolic activation systems, and to analyze the structure-activity relationship of these chemicals. MetHb₂₅ (a concentration of the aniline derivatives which produces 25% MetHb) showed statistically significant relationships with log P (n-octano-water partition coefficient) for alkyl and halogen derivatives. Adding to log P the dummy variables, which indicate the presence of hydrogen-bonding substituent, produced more significant relationships than with log P alone. MetHb also showed a significant relationship with steric parameters such as ML and L. MetHb formation tended to be greater with electron-withdrawing substituents although the relationship with σ , a Hammett's constant characterizing the electron-withdrawing power, was not statistically significant. This study showed MetHb forming potency of ρ -substituted anilines was linearly dependent on the properties of substituents, such as hydrophobicity, steric effect and hydrogen bonding potency. The present *in vitro* method using rat blood and hepatic metabolic activation systems seemed to be useful in assessing the potency of MetHb formation of chemicals.